

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b> <b>C07K 16/00, 16/42 // A61K 48/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 00/29442</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 25. Mai 2000 (25.05.00)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP99/08678 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 11. November 1999 (11.11.99)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 52 800.0      16. November 1998 (16.11.98)    DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT FREIBURG [DE/DE]; Fahnenbergplatz, D-79098 Freiburg (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> GRUNERT, Fritz [DE/DE]; St. Peter-Strasse 26, D-79341 Kenzingen (DE). THOMPSON, John [GB/DE]; Wilhelmstrasse 24a, D-79100 Freiburg (DE). ZIMMERMANN, Wolfgang [DE/DE]; Jacobistrasse 15, D-79104 Freiburg (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> LEDERER, KELLER & RIEDERER; Prinzregentenstrasse 16, D-80538 München (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, CA, IL, JP, MX, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
<b>(54) Title:</b> METHOD FOR PRODUCING ANTIBODIES ACTING AGAINST A POLYPEPTIDE THAT ONLY RECOGNISES THE CODING NUCLEIC ACID  <b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON ANTIKÖRPERN GEGEN EIN POLYPEPTID, VON DEM NUR DIE KODIERENDE NUKLEINSÄURE BEKANNT IST  <b>(57) Abstract</b>  <p>The present invention relates to a method for producing antibodies reacting specifically with a polypeptide that only recognises the coding nucleic acid, wherein said method comprises the following steps: a) the DNA coding the polypeptide is expressed in a host cell using a vector having at least one sequence coding a detection signal, and the expressed polypeptide is bound to a solid phase using the detection signal; b) regardless of step a), the DNA coding the polypeptide is introduced directly into an animal, which causes the expression of the polypeptide in the animal thus inducing the formation of antibodies acting against the polypeptide; and c), the polypeptide produced in step a) is used for reacting the antibodies formed in step b), for detecting them or for enriching them.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b>  <p>Offenbart wird ein Verfahren zur Erzeugung von Antikörpern, die spezifisch mit einem Polypeptid reagieren von dem die kodierende Nukleinsäure bekannt ist, worin a) die für das Polypeptid kodierende DNA mit Hilfe eines Vektors, der wenigstens eine für ein Auffindungssignal kodierende Sequenz aufweist, in einer Wirtszelle exprimiert wird und das exprimierte Polypeptid mit Hilfe des Auffindungssignals an eine feste Phase gebunden wird; b) unabhängig von Schritt a) die für das Polypeptid kodierende DNA direkt in ein Tier eingebracht wird, wodurch eine Expression des Polypeptids in dem Tier erfolgt, die die Bildung von Antikörpern gegen das Polypeptid verursacht und c) die in Schritt b) gebildeten Antikörper mit dem in Schritt a) gebildeten Polypeptid umgesetzt und nachgewiesen oder angereichert werden.</p>		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON ANTIKÖRPERN GEGEN EIN POLYPEPTID, VON DEM NUR DIE KODIERENDE NUKLEINSÄURE BEKANNT IST

In der Molekularbiologie stellt sich aufgrund der enormen Fortschritte der Sequenzierungsmöglichkeiten von Nukleinsäuren häufig das Problem, daß die genetische Information für ein Polypeptid bzw. Protein bekannt ist und, daß andererseits dieses Polypeptid bzw. Protein nicht in reiner Form vorliegt. Durch das sogenannte Human Genome Project werden laufend Nukleotidsequenzen veröffentlicht, häufig ist aber völlig unklar, welche Funktion die von diesen Genen kodierten Polypeptide bzw. Proteine haben.

Für die praktische Anwendung und Auswertung dieser wissenschaftlichen Erkenntnisse ist es in der Regel sehr hilfreich, wenn diese Proteine durch geeignete Antikörper nachgewiesen werden können. Durch den Einsatz derartiger Antikörper können entweder die Proteine gereinigt werden oder

es ist beispielsweise möglich, die Lokalisation der Proteine in Geweben und Zellen zu bestimmen.

Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Antikörper bereitzustellen, die gegen solche Polypeptide bzw. Proteine gerichtet sind, von denen zwar die Nukleotidsequenz bekannt ist, die aber nicht in angereicherter oder gar gereinigter Form vorliegen.

Herkömmlicherweise werden Antikörper so hergestellt, daß zunächst die Proteine aus den Zellen oder dem Gewebe gereinigt werden oder mit Hilfe von Bakterien oder in Insektenzellen oder Säugerzellen rekombinant hergestellt werden und, daß diese Proteine dann für die Immunisierung von Tieren verwendet werden. Diese Verfahren sind häufig sehr aufwendig und langwierig. Im Falle der Herstellung in Bakterien sind die so hergestellten Proteine häufig nicht identisch mit den natürlich vorkommenden Proteinen, da sich die Sekundärstruktur von den nativen Proteinen unterscheiden kann und da Bakterien nicht über dieselben posttranslationalen Modifikationsmechanismen verfügen, die bei eukaryotischen Organismen vorhanden sind.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Erzeugung von Antikörpern, die spezifisch mit einem Polypeptid reagieren von dem die kodierende Nukleinsäure bekannt ist, worin

- a) die für das Polypeptid kodierende DNA mit Hilfe eines Vektors, der wenigstens eine für ein Auffindungssignal kodierende Sequenz aufweist, in einer Wirtszelle exprimiert wird und das exprimierte Polypeptid mit Hilfe des Auffindungssignals an eine feste Phase gebunden wird,
- b) unabhängig von Schritt a) die für das Polypeptid kodierende DNA direkt in ein Tier eingebracht wird, wodurch eine

Expression des Polypeptids in dem Tier erfolgt, die die Bildung von Antikörpern gegen das Polypeptid verursacht und

- c) die in Schritt b) gebildeten Antikörper mit dem in Schritt a) gebildeten Polypeptid umgesetzt und nachgewiesen oder angereichert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren besteht im wesentlichen aus drei Schritten. Einerseits wird die für das Polypeptid kodierende DNA mit Hilfe eines Vektors in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert (Schritt a)). Da das mit Hilfe des Vektors exprimierte Polypeptid in der Wirtszelle in der Regel nur in einer verhältnismäßig geringen Konzentration vorliegt, wird erfindungsgemäß der eingesetzte Vektor mit einer Nukleotidsequenz versehen, die für eine Auffindungssequenz (tag-Sequenz) kodiert. Diese tag-Sequenz ist mit der für das Polypeptid kodierenden Sequenz verbunden, was dazu führt, daß das exprimierte Polypeptid zum Beispiel am C-Terminus diese Auffindungspeptidsequenz aufweist.

In dem unabhängig von Schritt a) durchgeführten Schritt b) wird die für das Polypeptid kodierende DNA in ein geeignetes Tier eingebracht und dort zur Expression gebracht. Die erfindungsgemäß verwendete genetische Immunisierung ermöglicht die direkte Bildung von Antikörpern in einem Wirtstier.

Bei dieser Methode der Herstellung von Antikörpern wird gereinigte DNA, die die genetische Information für das zu untersuchende Protein und geeignete Steuerelemente enthält, direkt in den für die Antikörperproduktion vorgesehenen Organismus (Maus, Kaninchen, etc.) injiziert. Die DNA wird von Zellen des Empfängerorganismus aufgenommen und das Protein, in nativer Form (d.h. mit korrekten posttranslationalen Modifikationen) exprimiert. Das für den Empfängerorganismus fremde Protein veranlaßt das Immunsystem, gegen das Fremdantigen gerichtete Antikörper zu produzieren (humorale

Immunantwort). Diese Methode ist bereits erfolgreich zur Produktion von hochaffinen, native Proteine erkennenden monoklonalen Antikörpern eingesetzt worden

Die für die genetische Immunisierung in Schritt b) zur Herstellung der gewünschten Antikörper eingesetzten Expressionsvektoren sollen auch *in vitro* zur Produktion des Zielproteins verwendet werden. Durch transiente Transfektion (Elektroporation, Lipofektion, etc.) werden die Expressionsvektoren in geeignete Zielzellen, insbesondere Säugerzellen eingeschleust, die dann das gewünschte Protein synthetisieren. Diese Zellen (intakt oder nach Lyse mit geeigneten Puffern) bzw. Medienüberstände (bei sezernierten Proteinen) sollen dazu dienen, den Protein-erkennenden Antikörper durch FACScan-Analysen (im Falle von zellständigen Proteinen) oder ELISA nachzuweisen.

Wenn ein fremdes Polypeptid in einer Wirtszelle exprimiert wird, kann das exprimierte Polypeptid üblicherweise durch Verwendung einer Sekretionssequenz oder Leadersequenz nach außen geschleust werden. In diesen Fällen ist es wichtig, daß das exprimierte und sezernierte Polypeptid ein Auffindungssignal aufweist, damit das Polypeptid aus dem Medium isoliert werden kann. Wenn aber das Polypeptid nicht nach außen geschleust wird, sondern an der Oberfläche der Zellmembran verbleibt, ist eine zusätzliche Auffindungssequenz nicht unbedingt erforderlich. In diesem Fall übernimmt diejenige Stelle des Polypeptids, die für die Verankerung zwischen Polypeptid und Zelle verantwortlich ist die Funktion der Auffindungssequenz. Da in diesem Fall das exprimierte Polypeptid mit der Zelle verbunden bleibt, können die gebildeten Antikörper durch Bindung an das Polypeptid und nachfolgender Reaktion mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper durch FACScan-Analysen nachgewiesen werden. Als Alternative ist auch ein Zell-ELISA möglich, bei dem die gebundenen Antikörper über einen mit einem Enzym gekoppelten

Sekundärantikörper und einer geeigneten Substratreaktion detektiert werden. Stellt die Verankerungssequenz eine Signalsequenz dar, die für eine Membranverankerung durch einen Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Rest verantwortlich ist, so kann das korrespondierende Expressionsplasmid sowohl zur DNA-Immunisierung als auch zum Nachweis der entstandenen Antigen-spezifischen Antikörper z.B. nach transienter Transfektion verwendet werden. Der Vorteil eines GPI-Ankers besteht darin, daß er leicht *in vivo* enzymatisch von der Zelloberfläche gespalten wird und sich somit, wie für sezernierte Proteine bekannt, eine gute Antikörperreaktion erzielen läßt (siehe Beispiel 7 für eine gute Immunantwort nach genetischer Immunisierung mit einem Expressionsplasmid, das für ein GPI-verankertes Protein kodiert).

Im Falle von sezernierten Proteinen (ggf. auch bei intrazellulär exprimierten Proteinen) ist es nötig, eine Auffindungssequenz (*tag*) dem Antigen rekombinant anzuhängen. Diese *tag*-Sequenz erlaubt es, mit Hilfe von mit ihr interagierenden, an eine feste Matrix gebunden Substanzen (z.B. die *tag*-Sequenz erkennende Antikörper; im Falle der His<sub>6</sub>-*tag*-Sequenz geeignete komplexierte Ni<sup>2+</sup>-Ionen), das Protein aus dem Zellüberstand bzw. Zelllysat herauszufischen. Als *tag*-Sequenz kommen insbesondere kurze und/oder wenig immunogene Peptidsequenzen in Frage. Als wenig immunogene *tag*-Sequenzen können (für die Herstellung von Antikörpern in Mäusen) auch Mausproteine dienen, die stimulierend auf die Antikörperproduktion wirken (z.B. GM-CSF, IL-4, IL-10 etc.) und gleichzeitig als *tag* fungieren können. Solche *tags* haben den Vorteil, aufgrund der Toleranz des immunisierten Tiers gegenüber diesen Selbstproteinen keine Immunantwort zu entwickeln. Falls die Bildung der die *tag*-Sequenz des rekombinanten Proteins erkennenden Antikörper nicht verhindert werden kann, können diese mit Hilfe von Konstrukten identifiziert werden, die für irrelevante, mit einem identischen *tag* versehene Proteine kodieren.

Das immobilisierte, durch transiente Transfektion hergestellte Protein dient nun dazu, aus dem Serum bzw. Hybridomkulturüberstand (bei der Herstellung von monoklonalen Antikörpern) die es erkennenden Antikörper zu binden. Der Nachweis der gebundenen spezifischen Antikörper erfolgt dann über enzymgekoppelte Anti-Antikörper (Nachweisantikörper), die über eine spezifische Substratumsetzung, in der Regel photometrisch, quantifizierbar sind. Die Spezifität und Sensitivität des Nachweissystems kann bei Verwendung von Peptid-tags bedeutend erhöht werden, wenn als Fängerantikörper  $F(ab)_2$ -Fragmente des anti-tag-Antikörpers und als Nachweisantikörper ein Fc-Region-erkennender Antikörper verwendet wird. Durch diese Konfigurierung des ELISA wird eine Kreuzerkennung des Fängerantikörpers ausgeschlossen.

Die für das Polypeptid kodierende Transkriptionseinheit kann am 3'-Ende eine Polyadenylierungssequenz aufweisen, die für die Stabilisierung einer eukaryotischen mRNA nötig ist.

Damit eine Expression des Polypeptids in der Wirtszelle stattfindet verfügt der Vektor üblicherweise über einen Promotor, wobei bevorzugt starke Promotoren verwendet werden. Als Beispiele können der Promotor des Elongationsfaktors  $\alpha$  oder der Promotor des Cytomegalovirus genannt werden.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die für das Polypeptid kodierende Nukleinsäure direkt in ein Tier eingebracht um dort Antikörper gegen das Polypeptid zu erzeugen. In bevorzugter Form liegt die dazu verwendete DNA in Form eines Vektors vor, der so gewählt wird, daß er gleichzeitig für die beiden Schritte a) und b) verwendet werden kann. Die Einführung der für das Polypeptid kodierenden DNA erfolgt in einer besonders bevorzugten Ausführungsform durch die Verwendung einer sogenannten gene gun. Bei der gene gun werden mikroskopisch kleine Goldpartikel mit der DNA, bevorzugt der Vektor bzw.



Plasmid-DNA umhüllt und auf die rasierte Haut des Versuchstieres geschossen. Dabei dringen die Goldpartikelchen in die Haut ein und die an ihnen aufgebrachte DNA wird in dem Wirtstier exprimiert. Bevorzugt werden erfindungsgemäß Labortiere, wie Maus, Ratte oder Kaninchen verwendet.

Um eine stärkere Antikörperbildung zu erzielen, werden in einer bevorzugten Ausführungsform zugleich mit der für das Polypeptid kodierenden DNA auch sogenannte genetische Adjuvantien appliziert. Hierbei handelt es sich um Zytokine (wie z.B. GM-CSF, IL-4, IL-10) exprimierende Plasmide, die die humorale Immunantwort in den Labortieren stimulieren.

Insbesondere wenn es sich bei dem verwendeten Labortier um eine Maus oder Ratte handelt, bietet sich die Bildung von Hybridomazellen an. Die immunisierten Mäuse werden geopfert, Milzzellen werden isoliert und mit Tumorzellen fusioniert und anschließend werden solche Klone selektioniert, die die gewünschten monoklonalen Antikörper sezernieren.

In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform werden bei Schritt a) die zu untersuchenden Polypeptide von den Wirtszellen sezerniert. Da mit den Polypeptiden ein Auffindungssignal verbunden ist, können die gesuchten Polypeptide dadurch isoliert werden, daß eine Bindung zwischen dem Auffindungssignal (tag-Sequenz) und einem geeigneten Liganden gebildet wird. Die tag-Sequenz ist vorzugsweise an einer festen Phase gebunden. Hierbei kann es sich um die Wände von Mikrotiterplatten, Gelkügelchen oder auch magnetische Kügelchen (sogenannte magnetic beads) handeln. Die magnetic beads haben den Vorteil, daß die das exprimierte Polypeptid enthaltende Lösung mit den magnetic beads leicht gemischt werden kann. Die magnetic beads weisen einen Liganden (bspw. Antikörperfragmente) auf, der an die tag-Sequenz bindet. Durch Anlegen eines magnetischen Feldes können dann die magnetic beads angereichert werden. Durch Wahl geeigneter Bedingungen

kann dann das gesuchte Polypeptid von den magnetic beads wieder eluiert werden, wenn die Antikörper angereichert werden sollen.

Gegenstand der vorliegenden Anmeldung sind auch solche Antikörper, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlich sind.

Figur 1 zeigt den Nachweis von anti-hp70-Antikörpern im Serum und im Kulturüberstand von aus Lymphknoten hp70-pcDNA3-DNA immunisierter Mäuse gewonnenen Hybridomen mit Hilfe von FACScan-Analyse. Für die FACScan-Analyse wurden entweder untransfizierte (graue Kurven) oder transient mit hp70-pcDNA3-DNA transfizierte BOSC-Zellen (weiße Kurven) verwendet. GV114, mit dem hp70-pcDNA3-Expressionsvektor immunisierte Maus. Der Versuch ist im Beispiel 7 näher erläutert.

Die vorliegende Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele näher erläutert.

### Beispiel 1

Herstellung von murinen monoklonalen Antikörpern mit Hilfe genetischer Immunisierung ohne gereinigtes Antigen (Protein)

#### a) *Expressionskonstrukt für die genetische Immunisierung*

Es wurde ein Expressionskonstrukt gewählt, das auf dem kommerziell erhältlichen Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen) basiert. Bei diesem Vektor wird die cDNA unter der Kontrolle des Cytomegalovirus (CMV)-Promotors exprimiert. Es können jedoch auch andere, bevorzugt starke, meist ubiquitär aktive Promotoren (z.B. der Promotor des Elongationsfaktor 1  $\alpha$  [EF-1 $\alpha$ ]-Gens) Verwendung finden. In die *Bam*HI/*Eco*RV-Schnittstellen der Polylinkersequenz wurde der für die extrazelluläre Domäne von *thyroid peroxidase* (TPO)-kodierende cDNA-Bereich des Menschen (2602 bp; 859 Aminosäuren) einkloniert und am 3'-Ende

noch mit einer für ein His<sub>6</sub>-tag-kodierende Region und einem nachfolgenden Stopkodon versehen (TPO sol.-His-pcDNA3). Die Plasmid-DNA wurde in *E. coli* vermehrt und mit Hilfe eines Qiagen-Plasmidisolierungskit (Qiagen, Hilden) gereinigt.

#### *b) Genetische Immunisierung von Mäusen*

Für die genetische Immunisierung gibt es grundsätzlich zwei unterschiedliche DNA-Applikationsverfahren. Die intramuskuläre Injektion oder die intrakutane Applikation mit Hilfe Gasdruck-beschleunigter mikroskopisch kleiner, mit Plasmid-DNA umhüllter Goldpartikel (*gene gun*). Für das Beispiel verwendeten wir das *gene gun*-Verfahren. Dazu wurden 200 µg TPO sol.-His-pcDNA3-DNA pro 25 mg Goldpartikel nach Vorschrift des Herstellers (*gene gun optimization kit*; Bio-Rad, München) aufgebracht. Zur genetischen Immunisierung wurde bei fünf Mäusen nach Narkotisierung (intraperitoneal) mit 110 µl Ketamin/Xylazin (100 mg/kg/16 mg/kg) das Bauchfell (ca. 4 cm<sup>2</sup>) mit parfümfreier Enthaarungsschere (Veet) entfernt und zweimal mit der *gene gun* (Helios Gene Gun; Bio-Rad) beschossen. Pro "Schuß" wurden 1 µg Plasmid-DNA appliziert. Nach 19 Tagen wurde die Immunisierung wiederholt und 14 Tage später Blut zur Bestimmung der Menge an spezifischen Antikörpern entnommen.

#### **Beispiel 2**

##### *Expression des Expressionskonstrukt-kodierten Proteins*

Zum Nachweis der spezifischen, durch die genetische Immunisierung gebildeten Antikörper muß das vom Expressionsplasmid kodierte Protein hergestellt werden. Um das Protein in nativer Form (ähnlich wie im immunisierten Tier) zu erhalten, wurde das Expressionskonstrukt durch Transfektion in BOSC23-Zellen [Pear et al., (1993) PNAS, 84, 8392-8396] gebracht. Bei den BOSC23-Zellen handelt es sich um eine modifizierte Adenovirus 5-transformierte humane embryonale

Nierenzelllinie (HEK293), die sehr gut transient transfizierbar ist. Die Zellen wurden in 6-Loch-Zellkulturschalen ausplattiert, so daß sie tags darauf eine 80%ige Konfluenz erreichten. Sie wurden dann dreimal mit je 2 ml serum- und antibiotikafreiem *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM)-Medium gewaschen und mit 2 µg Expressionsplasmid/10 µl Lipofectamin (Life Technologies, Eggenstein) in 1 ml serum- und antibiotikafreiem DMEM-Medium versetzt. Die DNA/Lipofectamin/Medium-Mischung wurde zuvor in einem Polystyrolgefäß zusammenpipettiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer 6-stündigen Inkubation bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> wurden 2 ml DMEM/20% fötales Kälberserum (FCS) zugegeben. 24 h nach Transfektion (entspricht dem Zeitpunkt der DNA-Zugabe) wurde das Medium durch 5 ml DMEM/5% FCS ersetzt. Nach weiteren 48 h (72 h nach Transfektion) wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und bei -70°C aufbewahrt.

### Beispiel 3

*Nachweis von spezifischen Antikörpern, die gegen das vom Expressionskonstrukt kodierte Protein gerichtet sind*

Zur Bindung des durch transiente Transfektion hergestellten His<sub>6</sub>-tag-Protein (TPO sol.-His) an Nickelchelat-Mikrotiterplatten (DUNN, Asbach) wurden die Vertiefungen mit je 200 µl Überstand des transienten Transfektionsansatzes (siehe oben) bzw. eines mock-transfizierten BOSC23-Kulturüberstandes über Nacht bei 4°C inkubiert, dann viermal mit Puffer A (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 M NaCl) und zweimal mit Puffer B (phosphate buffered saline (PBS), 0,1 % BSA, 0,05 % Tween 20) gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden anschließend durch Inkubation mit 300 µl 3 % Rinder-Serumalbumin (BSA)/PBS für 1 h bei Raumtemperatur blockiert und die Waschungen mit Puffer A und B wiederholt. Die Präimmun- und Immunseren der immunisierten Mäuse wurden 1:100 mit Puffer B verdünnt. Jeweils 100 µl der verdünnten Mäuseseren wurden in die Vertiefungen der

Nickelchelate-Mikrotiterplatten gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Vertiefungen je viermal mit Puffer C (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl, 0,1 % BSA, 0,05 % Tween 20), zweimal mit Puffer B gewaschen und anschließend mit 100 µl 1:2000 mit Puffer B verdünnten Kaninchen anti-Maus-Ig-Peroxydasekonjugat (DAKO, Hamburg) versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation wurden die Vertiefungen viermal mit Puffer C, zweimal mit Puffer B gewaschen, mit je 100 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Substratlösung (Fluka, Buchs, Schweiz) versetzt. Die Farbreaktion wurde nach ausreichender Entwicklung durch Zugabe von 50 µl 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und in einem ELISA-reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit der hier vorgestellten Erfindung wurden die spezifischen, gegen TPO gerichteten Antikörper "klassisch" mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen TPO-Antikörper-ELISAs (Varelisa TPO Antibodies; Pharmacia-Upjohn, Freiburg) nachgewiesen. Der Nachweis von anti-TPO-Antikörper erfolgt in diesem Testsystem durch gereinigtes rekombinantes TPO. Der anti-TPO-Antikörpergehalt der Präimmun- und Immunseren der immunisierten Mäuse wurde in einer Verdünnung von 1:100 nach Vorschrift des Herstellers bestimmt.

#### **Ergebnisse:**

Bei allen 5 mit TPO sol.-His-pcDNA3-DNA immunisierten Mäusen konnten, im Vergleich zu den Präimmunseren, bei einer Verdünnung von 1:100 eindeutig anti-TPO-Antikörper im Serum nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Nachweis von anti-TPO-Antikörpern im Serum TPO sol.-His-pcDNA3-DNA immunisierter Mäuse mit Hilfe von gereinigtem TPO-Protein (Varelisa TPO Antibodies-Nachweissystem).

Maus	Optische Dichte <sub>450 nm</sub>	
	Präimmunserum	Immunserum
GV1	0,09	2,53
GV2	0,06	1,97
GV3	0,07	1,13
GV4	0,08	1,63
GV5	0,08	0,60

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Nachweissystems wurde beispielhaft das Präimmun- und Immunserum einer Maus (GV1 von Tabelle 1) untersucht. Wie in Tabelle 2 zu sehen ist, können bei einer Serumverdünnung von 1:100 eindeutig anti-TPO-Antikörper im Immunserum nachgewiesen werden, während das Präimmunserum keine Reaktion zeigte.

**Tabelle 2:** Nachweis von anti-TPO-Antikörpern im Serum einer TPO sol.-His-pcDNA3-DNA immunisierten Maus mit Hilfe von durch transiente Expression erzeugtem TPO sol.-His-Protein.

Serum oder Puffer	Verdünnung mit Puffer A	Optische Dichte	
		TPO sol.-His	Medium
präimmun	1:100	0,17	0,15
immun	1:100	0,55	0,19
Puffer A	--	0,03	0,01

#### Beispiel 4

Herstellung von polyklonalen Antikörpern mit Hilfe genetischer Immunisierung ohne gereinigtes Antigen (Protein) in Kaninchen

##### a) Expressionskonstrukt für die genetische Immunisierung

Für das zweite Fallbeispiel wurde der ubiquitär aktive Promotor des Elongationsfaktor 1  $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ )-Gens zur Expressionssteuerung verwendet. Der verwendete Expressionsvektor basiert auf dem pBluescript-Vektor (Stratagene, Heidelberg), in den ein 1,2 kb Fragment des

humanen EF-1 $\alpha$ -Genpromotors, ein 0,7 kb *EcoRI*-Fragment mit dem Polyadenylierungssignal der humanen G-CSF-cDNA (Mizushima und Nagata, 1990), sowie zwischen die *BamHI*/*NotI*-Schnittstellen die für das Influenzavirus Hämagglutinin (HA)-tag-kodierende Oligonukleotidsequenz eingebaut wurden. In die *ClaI*/*BamHI*-Schnittstellen der Polylinkersequenz wurde der für die extrazelluläre Domäne des Aktivinrezeptors IIA kodierende cDNA-Bereich des Menschen (431 bp; 135 Aminosäuren) so einkloniert, daß am 3'-Ende die HA-tag-kodierende Region und ein nachfolgendes Stopkodon zu liegen kam (pEF-1 $\alpha$ -ActRII-HA).

*b) Genetische Immunisierung von Kaninchen*

Es wurden zur genetischen Immunisierung 100  $\mu$ g pEF-1 $\alpha$ -ActRII-HA-DNA pro 25 mg Goldpartikel nach Vorschrift des Herstellers (*gene gun optimization kit*; Bio-Rad, München) aufgebracht. Zwei Kaninchen (Chinchilla Bastard; Charles River, Sulzfeld) wurden nach Narkotisierung mit 50 mg/kg Pentobarbital und Enthaarung von 200 cm<sup>2</sup> Bauchfell mit Enthaarungscreme dreißigmal mit der *gene gun* beschossen. Pro "Schuß" wurden 1  $\mu$ g Plasmid-DNA-Gemisch appliziert. Nach 21 Tagen wurde die Immunisierung wiederholt und 21 Tage später Blut zur Bestimmung der Menge an spezifischen Antikörpern entnommen.

**Beispiel 5**

*Expression des Expressionskonstrukt-kodierten Proteins*

Die Herstellung des vom Expressionsplasmid pEF-1 $\alpha$ -ActRII-HA kodierten Proteins durch transiente Transfektion von BOSC23-Zellen erfolgte wie in Beispiel 2 beschrieben.

### Beispiel 6

*Nachweis von spezifischen Antikörpern, die gegen das vom Expressionskonstrukt-kodierte Protein gerichtet sind*

Zur Bindung des durch transiente Transfektion hergestellten HA-tag-Protein (EF-1 $\alpha$ -ActRII-HA) an Mikrotiterplatten wurden die Vertiefungen zunächst mit dem F(ab)<sub>2</sub>-Fragment des anti-HA-tag-Antikörper beschichtet. Dazu wurden 150  $\mu$ l des Antikörperfragments je Vertiefung der Mikrotiterplatte gegeben und bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen und freie Proteinbindungsstellen durch Inkubation mit 200  $\mu$ l 0,2% BSA/PBS blockiert.

Anschließend wurde der Überstand des transienten Transfektionsansatzes (siehe Beispiel 5) bzw. eines mock-transfizierten BOSC23-Kulturüberstandes für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, dann dreimal mit *phosphate-buffered saline* (PBS) gewaschen. Die Präimmun- und Immunseren der immunisierten Kaninchen wurden 1:100 bzw. 1:500 mit 0,2% BSA/PBS verdünnt. Jeweils 100  $\mu$ l der verdünnten Kaninchenserum wurden in die Vertiefungen der beschichteten Mikrotiterplatten gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Vertiefungen je dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 100  $\mu$ l 1:2000 mit PBS/0,2% BSA verdünnten Ziege-anti-Kaninchen-Ig-Peroxydasekonjugat (DAKO, Hamburg) versetzt. Nach einer 1-stündigen Inkubation wurden die Vertiefungen dreimal mit PBS gewaschen, mit je 100  $\mu$ l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Substratlösung (Fluka, Buchs, Schweiz) versetzt. Die Farbreaktion wurde nach ausreichender Entwicklung durch Zugabe von 50  $\mu$ l 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und in einem ELISA-reader gemessen. Die Ergebnisse zeigten, daß durch das erfindungsgemäße Verfahren auch in Kaninchen spezifische polyklonale Antikörper gegen ein unbekanntes Genprodukt erzeugt werden können.



### Beispiel 7

*Herstellung von murinen monoklonalen Antikörpern gegen ein humanes GPI-verankertes Oberflächenprotein mit Hilfe genetischer Immunisierung*

#### a) *Expressionskonstrukt für die genetische Immunisierung*

Für die genetische Immunisierung wurde die vollständige hp70-cDNA, die für ein 70 kDa GPI-verankertes humanes Oberflächenprotein kodiert, in pcDNA3 kloniert (hp70-pcDNA3) und vermehrt (siehe Beispiel 1). Die humane hp70-Aminosäuresequenz stimmt mit der murinen hp70-Sequenz in ca. 70% der Reste überein.

#### b) *Genetische Immunisierung von Mäusen*

Die Immunisierung der Mäuse mit der *gene gun* (siehe Beispiel 1b) wurde nach einem Kurzprotokoll (6 Immunisierungen innerhalb von 13 Tagen), wie von Kilpatrick et al. (1998), Hybridoma 17: 569-576 beschreiben, durchgeführt.

#### c) *Herstellung von Hybridomen zur Produktion von monoklonalen Antikörpern*

Zur Herstellung von Hybridomen wurden Lymphozyten aus den regionalen (axillären, brachialen, inguinalen und poplitealen) Lymphknoten von drei Mäusen isoliert und nach einem Standardprotokoll mit exponential wachsenden SP2/0-Mausmyelomzellen (American Tissue Type Culture Collection) mit Hilfe von Polyethylenglykol (Sigma) fusioniert (Campbell A M (1986). Monoclonal antibody technology: The production and characterization of rodent and human monoclonal antibodies. Book series: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (R H Burdon and P H van Knippenberg, eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam). Je  $2 \times 10^5$  fusionierte

Lymphknotenlymphozyten wurden pro Vertiefung einer 96-well-Mikrotiterplatte ausplattiert und in jeweils 100 µl Hypoxanthin/Aminopterin Thymidin (HAT)-haltigen DMEM-Medium (Sigma) mit 20% FCS und 5% *Hybridoma Enhancing Factor* (Sigma) kultiviert.

- d) *Nachweis von spezifischen Antikörpern mit Hilfe von Zellen, in denen das für die genetische Immunisierung verwendete Expressionskonstrukt nach transienter Transfektion exprimiert wird*

Kandidatenhybridomklone wurden mit Hilfe eines Zell-ELISA identifiziert. Dazu wurden BOSC-Zellen, wie in Beispiel 2 beschrieben, transient mit dem hp70-pcDNA3-Expressionskonstrukt transfiziert, in 4% Formaldehyd in PBS resuspendiert und für 10 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS 1:10 verdünnt und bei 4°C bis zu vier Wochen aufbewahrt.

#### *Zell-ELISA*

96-well-Rundboden-Mikrotiterplatten wurden durch Zugabe von 300 µl 1% BSA in PBS für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Nach Entfernen der Lösung durch Inversion der Platte wurden jeweils 75 µl des Hybridomzellüberstands und 10 µl transient transfizierte BOSC-Zellsuspension ( $6 \times 10^6$  Zellen/ml 1% BSA in PBS) zugegeben und 1 h bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl 1% BSA in PBS wurde für 4 min bei 300x g zentrifugiert und der Überstand wie oben abgekippt. Die Zellen wurden nochmals mit 200 µl 1% BSA/PBS gewaschen, in 75 µl, Peroxidasegekoppeltem Ziege-anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper (DAKO), 1:2.000-verdünnt in 1% BSA/PBS, resuspendiert und für 1h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl 0,1% Tween 20/PBS zugesetzt und wie oben zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden dann dreimal mit je 200 µl 0,1% Tween 20/PBS und zweimal mit je 200 µl PBS gewaschen. Zur Bestimmung der Immunglobulinklasse (IgG oder IgM) der

monoklonalen Antikörper in den Hybridomüberständen wurden Peroxidase-gekoppelte Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper (1:2.000-verdünnt) oder Ziege-anti-Maus-IgM-Antikörper (1:2.000-verdünnt) verwendet (Southern Biotechnologies Associates). Die über die Antikörper an die Zellen gebundene Peroxidase wurde durch Zugabe von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Substratlösung wie in Beispiel 3 beschrieben quantifiziert.

#### Ergebnisse:

Mit der oben beschriebenen Fusion wurden insgesamt 176 mit Hybridomen bewachsene Mikrotitervertiefungen erhalten. Davon erwiesen sich 64 Überstände als positive für anti-hp70-Antikörper, legt man einen OD<sub>450</sub>-Wert, der doppelt so hoch wie der mit Medium erhaltene Leerwert ist (Leerwert: 0,035), als Schwellenwert zugrunde. In Tabelle 3 sind die für einen negativen (N1B10) und für einen positiven Hybridomüberstand (N1F4) gemessenen Werte aufgeführt. In Vergleich sind die im selben Test erhaltenen OD-Werte für das Immun- und Präimmunserum einer für die hp70-Hybridomherstellung verwendeten Maus (GV114) gezeigt. Dieselben N1B10- und N1F4-Hybridomüberstände wurden auch mit Hilfe einer FACScan (*fluorescence-activated cell scanning*)-Analyse auf Anwesenheit von spezifischen anti-hp70-Antikörpern getestet (siehe unten).

**Tabelle 3:** Nachweis von anti-hp70-Antikörpern im Serum und im Kulturüberstand von aus Lymphknoten hp70-pcDNA3-DNA immunisierter Mäuse gewonnenen Hybridomen mit Hilfe eines Zell-ELISA. Für den Zell-ELISA wurden transient mit hp70-pcDNA3-DNA transfizierte BOSC-Zellen verwendet.

Serum bzw. Hybridomüberstand	Verdünnung	Optische Dichte <sub>450 nm</sub>
Präimmunserum GV114	1:100	0,08
Immunserum GV114	1:100	1,21
Hybridomüberstand N1B10	unverdünnt	0,05
Hybridomüberstand N1F4	unverdünnt	1,07

### *FACScan-Analyse*

Jeweils 10 µl der unter Zell-ELISA beschriebenen Suspension fixierter transient transfizierter BOSC-Zellen ( $20 \times 10^6$  in 3% FCS/PBS) wurde in eine 96-well-Mikrotiterrundbodenplatte pipettiert und 75 µl der jeweiligen Hybridomüberstände zugegeben. Zur Kontrolle wurden Zellen mit entweder 25 µl 1:100 mit 3% FCS/PBS verdünnten Präimmun- oder Immunseren bzw. mit 25 µl eines monoklonalen Kontrollantikörpers (50 µg/ml 3% FCS/PBS) versetzt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 4°C wurden je 200 µl 3% FCS/PBS zugegeben, die Zellen wie oben abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach einmaligem Waschen mit 200 µl 3% FCS/PBS wurden 25 µl eines 1:50 mit 3% FCS/PBS verdünnten (Endkonzentration: 10 µg/ml), mit Phycoerythrin-gekoppelten Ziege-anti-Maus-Immunglobulin-Antikörpers (Southern Biotechnologies Associates) zugesetzt und 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal wie oben gewaschen und in einem FACScan-Gerät (Becton Dickinson) die Fluoreszenz vermessen.

### **Ergebnisse:**

Von den im Zell-ELISA als positiv bestimmte Hybridomüberstände (siehe oben) wurden 20 Überstände, die OD<sub>450</sub>-Werte von >0,2 ergaben, für die anti-hp70-Antikörperbestimmung durch FACScan-Analyse ausgewählt. In Figur 1B sind die für einen irrelevanten als negative Kontrolle verwendeten Antikörper (26/3/13) und für den positiven Hybridomüberstand N1F4 erhaltenen Histogramme mit transient mit dem hp70-pcDNA3-Expressionsvektor transfizierten oder nichttransfizierten BOSC-Zellen gezeigt. In Vergleich sind die im selben Test erhaltenen Histogramme für das Immun- und Präimmunserum einer für die Hybridomherstellung verwendeten Maus abgebildet (Figur 1A). Alle 20 ausgewählten Hybridomüberstände erwiesen sich als positiv in der FACScan-Analyse. In 19 der insgesamt 20 Überstände wurden die Immunglobulinklasse der hp70-spezifischen Antikörper bestimmt.

Zwei der getesteten Überstände enthielten hp70-spezifische IgM-Antikörper, 17 Überstände hp70-spezifische IgG-Antikörper.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Erzeugung von Antikörpern, die spezifisch mit einem Polypeptid reagieren von dem die kodierende Nukleinsäure bekannt ist, worin

- a) die für das Polypeptid kodierende DNA mit Hilfe eines Vektors, der wenigstens eine für ein Auffindungssignal kodierende Sequenz aufweist, in einer Wirtszelle exprimiert wird und das exprimierte Polypeptid mit Hilfe des Auffindungssignals an eine feste Phase gebunden wird,
- b) unabhängig von Schritt a) die für das Polypeptid kodierende DNA direkt in ein Tier eingebracht wird, wodurch eine Expression des Polypeptids in dem Tier erfolgt, die die Bildung von Antikörpern gegen das Polypeptid verursacht und
- c) die in Schritt b) gebildeten Antikörper mit dem in Schritt a) gebildeten Polypeptid umgesetzt und nachgewiesen oder angereichert werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der in Schritt a) verwendete Vektor am C-Terminus der für das Polypeptid kodierenden DNA eine Sequenz aufweist, die für das Auffindungssignal kodiert.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Auffindungssequenz ausgewählt ist aus der His<sub>6</sub>-tag-Sequenz, der Hämagglutinin-Sequenz eines Influenzavirus oder der myc-tag-Sequenz.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der für das Polypeptid kodierende Vektor am C-terminalen Ende der Auffindungssequenz eine Polyadenylierungssequenz aufweist.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der für das Polypeptid kodierende Vektor am 5'-Ende der für das Polypeptid kodierenden DNA-Sequenz einen starken Promotor aufweist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der starke Promotor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus starken eukaryotischen Promotoren, insbesondere dem Promotor des Elongationsfaktors 1  $\alpha$  oder des Cytomegalovirus-Promotors.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die für das Polypeptid kodierende DNA, die gemäß Schritt b) direkt in ein Tier eingebracht wird in einem Vektor vorliegt.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die für das Polypeptid kodierende DNA in Schritt b) mit Hilfe einer gene gun in das Tier eingebracht wird.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem in Schritt b) eingesetzten Tier um eine Maus, eine Ratte oder ein Kaninchen handelt.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt b) zusätzlich zu der für das Polypeptid kodierenden DNA ein genetisches Adjuvans appliziert wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das genetische Adjuvans ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Zytokinexpressionsvektoren, die die Antikörperproduktion erhöhen.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß geeignete Zellen eines gemäß Schritt b) immunisierten Tieres für die Herstellung von

Hybridomazellen zur Bildung von monoklonalen Antikörpern verwendet werden.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das in Schritt a) gebildete Polypeptid durch Bindung des Auffindungssignals an einen hiergegen gerichteten Antikörper oder ein Antikörperfragment an eine feste Phase gebunden wird.

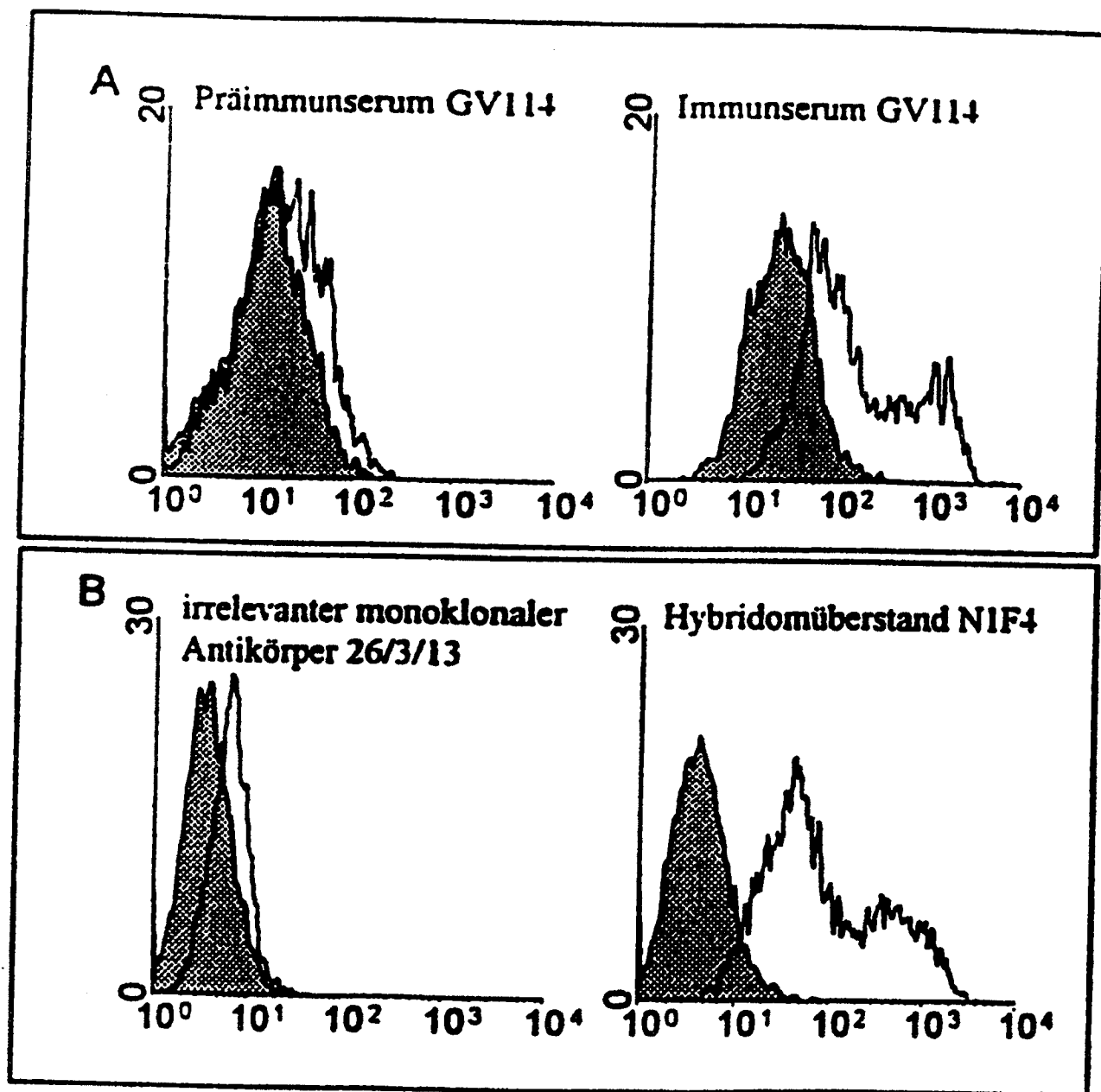
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der festen Phase um Mikrotiterplatten, Gelkugeln oder magnetische Kügelchen handelt.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der in Schritt b) gebildete Antikörper nach Bindung an das in Schritt a) gebildete Polypeptid mit Hilfe eines gegen den Antikörper gerichteten Anti-Antikörpers nachgewiesen wird.

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der in Schritt c) an das exprimierte Polypeptid gebundene Antikörper durch Elution freigesetzt wird.

17. Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er nach einem der Verfahren gemäß Anspruch 1-17 erhältlich ist.



Fig. 1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 99/08678

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K16/00 C07K16/42 //A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 97 07132 A (COMMW SCIENT IND RES ORG ;WANG LINFA (AU)) 27 February 1997 (1997-02-27) page 5, line 30 -page 6, line 4 page 7, line 12 -page 8, line 17 page 29, line 1-8 examples 4,9 table 1	1-17
Y	WO 94 27435 A (LIFE TECHNOLOGIES INC) 8 December 1994 (1994-12-08) page 10, line 15 -page 11, line 10 page 19, line 20-23 claims 14,15	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## ° Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 February 2000

Date of mailing of the international search report

14/02/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Covone, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/08678

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>ULIVIERI C ET AL: "Generation of a monoclonal antibody to a defined portion of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin by DNA immunization" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 51, no. 2, 1 November 1996 (1996-11-01), pages 191-194, XP004037124 ISSN: 0168-1656 abstract page 192, left-hand column, paragraph 2 -----</p>	1-17

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/08678

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 9707132 A	27-02-1997	AU 700977 B	14-01-1999
		AU 6696496 A	12-03-1997
		CA 2229540 A	27-02-1997
		EP 0845004 A	03-06-1998
		JP 11510683 T	21-09-1999
W0 9427435 A	08-12-1994	EP 0702516 A	27-03-1996
		JP 9500013 T	07-01-1997

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/08678

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
 IPK 7 C07K16/00 C07K16/42 //A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 97 07132 A (COMMW SCIENT IND RES ORG ;WANG LINFA (AU)) 27. Februar 1997 (1997-02-27) Seite 5, Zeile 30 -Seite 6, Zeile 4 Seite 7, Zeile 12 -Seite 8, Zeile 17 Seite 29, Zeile 1-8 Beispiele 4,9 Tabelle 1	1-17
Y	WO 94 27435 A (LIFE TECHNOLOGIES INC) 8. Dezember 1994 (1994-12-08) Seite 10, Zeile 15 -Seite 11, Zeile 10 Seite 19, Zeile 20-23 Ansprüche 14,15	1-17

-/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

7. Februar 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

14/02/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P. B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Covone, M

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int .tionales Aktenzeichen

PCT/EP 99/08678

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>ULIVIERI C ET AL: "Generation of a monoclonal antibody to a defined portion of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin by DNA immunization"</p> <p>JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, Bd. 51, Nr. 2, 1. November 1996 (1996-11-01), Seiten 191-194, XP004037124 ISSN: 0168-1656 Zusammenfassung Seite 192, linke Spalte, Absatz 2 -----</p>	1-17

# INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/08678

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9707132 A	27-02-1997	AU 700977 B	14-01-1999
		AU 6696496 A	12-03-1997
		CA 2229540 A	27-02-1997
		EP 0845004 A	03-06-1998
		JP 11510683 T	21-09-1999
WO 9427435 A	08-12-1994	EP 0702516 A	27-03-1996
		JP 9500013 T	07-01-1997